

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Juni 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/43708 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 9/50 (74) Anwälte: LESON, Thomas, Johannes, Alois usw.;  
Tiedtke-Bühling-Kinne, Bavariaring 4, 80336 Munich (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13926
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. November 2001 (28.11.2001) (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 59 151.5 29. November 2000 (29.11.2000) DE
- (71) Anmelder und
- (72) Erfinder: ALEXIOU, Christoph [DE/DE]; Elisabethstrasse 8, 80796 München (DE). BERGEMANN, Christian [DE/DE]; Bamberger Strasse 51, 10777 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts  
— insgesamt in elektronischer Form (mit Ausnahme des Kopfbogens); auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/43708 A2

(54) Title: MAGNETIC PARTICLES FOR THE TARGETED REGIONAL THERAPY

(54) Bezeichnung: MAGNETISCHE PARTIKEL ZUR ZIELGERICHTETEN REGIONALEN THERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to magnetic particles that comprise a magnetic substance combined with a therapeutic substance. The particles according to the invention are used for the regional magnetotherapy of diseases by intra-arterial application.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beschreibt magnetische Partikel, die eine magnetische Substanz in Kombination mit einer therapeutischen Substanz umfassen, zur Magnetfeld-unterstützten, regionalen Therapie von Krankheiten mittels intraarterieller Applikation.

BEST AVAILABLE COPY

### Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft magnetische Partikel zur zielgerichteten regionalen Therapie von Krankheiten, insbesondere zur Behandlung beim Menschen. Die Erfindung eignet sich besonders gut zur regionalen Behandlung gegen Tumore, lokale Infektionen und lokale Entzündungen und ähnliche lokale Krankheitszustände.

Die Therapie von Krankheiten ist in der Regel eine Balanceakt zwischen der Wirksamkeit und der Toxizität des eingesetzten Wirkstoffs. Dies gilt insbesondere für die Chemotherapie mit den in der Regel toxischen Cytostatika. Eine Reihe von Strategien wurden deshalb entwickelt, um diesem Dilemma zu begegnen.

Eine Strategie mit der Bezeichnung "Magnetic Drug Targeting" beruht darauf, therapeutisch wirksame Substanzen an magnetische Partikel als Trägersystem zu binden, um Magnetfeld-unterstützt die therapeutische Substanz regional bzw. lokal anzureichern und somit eine höhere Wirksamkeit am gewünschten Therapieort bei gleichzeitiger Reduzierung systemisch bedingter Nebenwirkungen zu erzielen. Dabei handelt es sich um spezielle Anwendungen der für breite technische Bereiche entwickelten magnetischen Flüssigkeiten, den so genannten Ferrofluiden.

Versuche, eine gezielte Chemotherapie mit magnetischen, Arzneimittel-beladenen Albumin-Mikropartikeln unter Zuhilfenahme von Magnetfeldern durchzuführen, werden von K.J. Widder et al. in Eur. J. Cancer Clin. Onkol., Vol. 19, S. 135-139 (1983) und P.K. Gupta und C.T. Hung in N. Willmot und J. Daly (Hrg.), "Microspheres and Regional Cancer Therapy", S. 71-116, CRC Press, Boca Rayton (FL) (1991), beschrieben. Dabei liegt der Wirkstoff im von Albumin beschichteten Kern

vor, was jedoch eine Phagozytose notwendig macht, um den Wirkstoff frei zu setzen.

Die DE-A-19 624 426 beschreibt magnetische Partikel, die  
5 einen Kern mit nanokristallinen magnetischen Teilchen und  
eine Hülle aus Polymeren mit solchen reaktiven Gruppen  
umfassen, die zur kovalenten Bindung oder zum Ionenaustausch  
befähigt sind. Es wird vorgeschlagen, therapeutische  
Wirkstoffe, wie z.B. die Cytostatika Doxorubicin oder  
10 Mitoxantron, beispielsweise über Ionentauscherreaktionen an  
die magnetischen Teilchen zu binden und anschließend in Form  
einer Dispersion intravenös zu applizieren. Unter Bezugnahme  
auf andere Dokumente des Stands der Technik wird in der DE-A-  
19 624 426 einleitend erwähnt, dass dort - bedingt durch die  
15 Struktur und den Aufbau jener magnetischen Partikel - z.B.  
intraarteriell zu injizieren ist, was aber in der klinischen  
Praxis zu erheblichen Problemen führen soll. Die eigentliche  
Lehre der DE-A-19 624 426 nimmt daher von einem solchen  
Applikationsweg Abstand und zieht aufgabengemäß nur eine  
20 intravenöse Applikation in Betracht.

Ferner beschreiben A.S. Lübbe et al. in Cancer Res., Vol. 56,  
S. 4694-4701 (1996) präklinische Experimente an Tieren  
mittels Magnetfeld-unterstützten Wirkstoff-Targetings bei  
25 intravenöser Applikation. Ferner wurden durch A.S. Lübbe et  
al. in Cancer Res., Vol. 56, S. 4686-4693 (1996) Studien zur  
Bioverträglichkeit von mit 4'-Epidoxorubicin beladenen magne-  
tischen Partikeln beschrieben.

30 Die tatsächliche therapeutische Wirksamkeit von mit therapeu-  
tischen Substanzen beladenen magnetischen Teilchen ist jedoch  
bisher noch nicht beschrieben worden. Insbesondere gibt der  
oben genannte Stand der Technik nicht die Bedingungen wieder,  
welche für eine effiziente und wirksame regionale bzw. lokale  
35 Therapie von Krankheiten bei gleichzeitiger Minimierung  
systemisch bedingter Nebenwirkungen erforderlich sind.

Es war daher Aufgabe vorliegender Erfindung, technischen Mittel und Wege zur Verfügung zu stellen, um die regionale bzw. lokale Therapie von Krankheiten zu verbessern.

5

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass magnetische Partikel, die eine magnetische Substanz in Kombination mit einer therapeutischen Substanz umfassen, zur Magnetfeld-unterstützten, regionalen Therapie von Krankheiten  
10 mittels intraarterieller Applikation eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung und die bevorzugten Ausführungsformen werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beige-fügten Figuren näher erläutert.

15

Fig. 1 zeigt die Magnetresonanz-Bilddarstellung von Tumoren (VX-2-Karzinom) von Kaninchen nach intraarterieller (Fig. 1A) bzw. intravenöser (Fig. 1B) Applikation magnetischer Partikel und nach 60-minütiger Anwendung eines externen magnetischen  
20 Feldes (Magnetresonanz-Bildaufnahmen 6 h danach).

Fig. 2 zeigt einen histologischen Schnitt durch den VX-2-Tumor unmittelbar nach der Magnetfeld-unterstützten, regionalen Therapie gemäß der vorliegenden Erfindung.

25

Die Figuren 3A, 3B und 3C zeigen vergrößert unterschiedliche Bereiche der jeweils in Fig. 2 als Felder A, B und C dargestellten Sektionen.

30 Fig. 4 zeigt die reversible Bindung einer therapeutischen Substanz über ionische Wechselwirkung an ionisch geladene Gruppen der Polymerhülle der magnetischen Partikel gemäß einer Ausführungsform vorliegender Erfindung.

35 Die Figuren 5A bis 5G veranschaulichen die Wirkung der erfindungsgemäßen, Magnetfeld-unterstützten, regionalen Therapie

mittels magnetischer Partikel im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen und Vergleichsproben.

Fig. 6 zeigt ein Beispiel einer Nebenwirkung (Leukozyten-  
5 werte) im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen, Magnetfeld-  
unterstützten, regionalen Therapie mittels magnetischer  
Partikel im Vergleich zu Kontrollgruppen und Vergleichs-  
proben.

10 Fig. 7A zeigt die Abwesenheit weiterer Nebenwirkungen im  
erfindungsgemäßen System im Gegensatz zum in Fig. 7B  
ersichtlichen Auftreten von Nebenwirkungen bei einer  
Kontrollgruppe.

15 Fig. 8 zeigt schematisch die quantitative Anreicherung von  
 $^{59}\text{Fe}$  mit und ohne Magnetfeldunterstützung. (Magnetic  
Targeting) in unterschiedlichen Geweben und Organen.

Fig. 9A zeigt die quantitative Bestimmung der Verteilung des  
20 Wirkstoffs Mitoxantron mittels HPLC-Analyse bezüglich des  
freigesetzten Wirkstoffs nach intraarterieller Applikation  
des Wirkstoffs ohne Magnetfeldeinwirkung in unterschiedlichen  
Geweben und Organen.

25 Fig. 9B zeigt die quantitative Bestimmung der Verteilung des  
Wirkstoffs Mitoxantron mittels HPLC-Analyse bezüglich des  
freigesetzten Wirkstoffs nach erfindungsgemäßer intraarte-  
rieller Applikation des Wirkstoffs mit Magnetfeldeinwirkung  
in unterschiedlichen Geweben und Organen.

30 Fig. 10A zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Mitoxantron in  
Prozentangaben nach intraarterieller Applikation des  
Wirkstoffs ohne Magnetfeldeinwirkung bezogen auf die  
applizierte Menge an Mitoxantron in unterschiedlichen Geweben  
35 und Organen.

Fig. 10B zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Mitoxantron in  
Prozentangaben nach erfindungsgemäßer intraarterieller

Applikation des Wirkstoffs mit Magnetfeldeinwirkung bezogen auf die applizierte Menge an Mitoxantron in unterschiedlichen Geweben und Organen.

- 5 Fig. 11 zeigt die quantitative Bestimmung der Verteilung des Wirkstoffs Mitoxantron mittels HPLC-Analyse bezüglich des freigesetzten Wirkstoffs nach intravenöser Applikation des Wirkstoffs in unterschiedlichen Geweben und Organen.
- 10 Fig. 12 zeigt die Verteilung des Wirkstoffs Mitoxantron in Prozentangaben nach intravenöser Applikation des Wirkstoffs bezogen auf die applizierte Menge an Mitoxantron in unterschiedlichen Geweben und Organen.
- 15 Ein wesentliches Kriterium der erfindungsgemäßen Konzeptes besteht darin, dass die magnetischen Partikel, die die magnetische Substanz und die therapeutische Substanz kombiniert umfassen, in einer Ausgestaltung zur intraarteriellen Applikation vorliegen. Es hat sich überraschend herausge-
- 20 stellt, dass die lokale Anreicherung am gewünschten Zielort sowie die regionale Wirksamkeit der therapeutischen Substanz signifikant verbessert werden und gleichzeitig schädliche Nebenwirkungen minimiert werden, wenn eine intraarterielle Applikation vorgesehen ist und nicht wie im eingangs be-
- 25 schriebenen Stand der Technik intravenös.

Die wesentlich bessere regionale Anreicherung von mit einer therapeutischen Substanz beladenen magnetischen Partikeln für die zielgerichtete, regionale Therapie im Falle einer intra-

30 arteriellen Applikation ist in Fig. 1A im Vergleich zu dem Ergebnis einer intravenösen Applikation (Fig. 1B) in Form von Magnetresonanzbild-Darstellungen am Beispiel eines Tumors in den hinteren Gliedmaßen (VX-2-Karzinom) von Kaninchen gezeigt. Die Magnetresonanz-Darstellung wurde aufgenommen 6

35 Stunden, nachdem magnetische Partikel, die mit einem Cyto- statikum beladen waren, entweder intraarteriell oder intra- venös in dafür jeweils geeigneten Flüssigkeiten appliziert

wurden und anschließend 60 Minuten ein inhomogenes Magnetfeld, dessen Pol auf die Tumorstelle gerichtet war, angelegt wurde. Der Tumor im medialen Oberschenkelbereich der hinteren Gliedmaßen wird durch eine gepunktete, ovale Linie angezeigt, wobei die mit einem "f" markierte Fläche den Kopf des Oberschenkelknochens (Femur) anzeigt. Die in Fig. 1A ersichtlichen, auf den Tumorbereich beschränkten definierten Extinktionssignale der Magnetresonanz-Darstellung belegt die hohe Anreicherung der mit der therapeutischen Substanz beladenen magnetischen Partikel in stabilem Zustand auch 6 Stunden nach Applikation und zielgerichteter Anreicherung mittels Magnetkraft, während der Vergleich mit der intravenösen Applikation in Fig. 1B nahezu keine Signalextinktion zeigt.

Im Rahmen experimenteller Untersuchungen mit magnetischen Partikeln, die zum quantitativen Nachweis radioaktiv markiert waren, wurde nachgewiesen, dass sogar 80% bis 90% der erfindungsgemäß eingesetzten magnetischen Partikel bei intraarterieller Applikation im Tumor oder im peritumoralen Gebiet konzentriert werden konnten. Dies belegt den signifikanten Vorteil der vorliegenden Erfindung, wonach für eine gleiche Wirksamkeit der herkömmlich applizierten therapeutischen Substanz eine verringerte Dosis, vorzugsweise eine wesentlich verringerte Dosis der entsprechenden therapeutischen Substanz erforderlich ist, was zu erheblich weniger Nebenwirkungen führt. Aufgrund dieser ausgezeichneten Anreicherung im Zielgebiet konnte erfindungsgemäß am Beispiel eines Tumors bereits bei einmaliger Applikation eine vollständige Remission des Tumors erreicht werden. Eine Embolisation aufgrund der eingesetzten magnetischen Partikel wurde nicht beobachtet.

Ferner wurde gefunden, dass mit der erfindungsgemäßen Ausgestaltung zur intraarteriellen Applikation der mit der therapeutischen Substanz beladenen magnetischen Partikel eine ausgezeichnete Verteilung der magnetischen Partikel durch den

gesamten Tumor erreicht wird. Dies wird anhand der in den Figuren 2 und den damit zusammenhängenden Figuren 3A, 3B und 3C dargestellten histologischen Befunde gezeigt. Bei der erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden die hohen Mengen an magnetischen Partikeln über den gesamten Tumorbereich hinweg erzielt, wie an den Gesamtschnitten des Tumors in Fig. 2 anhand der Ansammlungen der braun-schwarz sichtbaren magnetischen Partikel deutlich wird. Es gibt eng lokalisierte Bereiche mit Ansammlungen magnetischer Partikel besonders hoher Dichte, aber auch über den gesamten Tumor zerstreute und verteilte magnetische Partikel in geringerer Dichte. Eine genauere Untersuchung des in Fig. 2 als Feld A gekennzeichneten Bereiches zeigt ferner (s. Fig. 3A), dass das Blutgefäß, welches den Tumor versorgt, eine hohe intramurale Konzentration der zum Magnetfeld orientierten magnetischen Partikel aufweist. Im interstitialen Bereich des Tumorgewebes (s. Feld B, das in Fig. 3B vergrößert dargestellt ist) liegen ebenfalls zahlreiche, hochkonzentrierte Anreicherungen von magnetischen Partikeln vor (in Fig. 3B durch Pfeile dargestellt). Schließlich zeigt auch der in Fig. 3C dargestellte Übergangsbereich zwischen Muskulatur und Tumorgewebe eine Vielzahl von hochkonzentrierten Ansammlungen magnetischer Partikel, die als schwarze Kondensationen innerhalb und außerhalb des Tumors ersichtlich sind.

25 Damit die magnetischen Partikel zur regionalen Therapie von Krankheiten über intraarterielle Applikation verabreicht werden können, liegen die magnetischen Partikel üblicherweise in einer zur intraarteriellen Applikation geeigneten Form vor, geeigneter Weise in einer dem Fachmann geläufigen, zur Infusion oder Perfusion ausgestalteten Flüssigkeit. Die Flüssigkeit sollte biokompatibel und nicht immunogen sein, insbesondere steril und pyrogenfrei.

35 Die magnetischen Partikel können im Hinblick auf die Kombination zwischen der magnetischen Substanz und der therapeuti-



schen Substanz erfindungsgemäß grundsätzlich in Form von zwei alternativen Ausgestaltungen vorliegen. Im ersten Fall liegt die therapeutische Substanz reversibel gebunden an der Oberfläche der magnetischen Partikel mit einer magnetischen

5   Kernsubstanz vor, wohingegen bei der zweiten Alternative die therapeutische Substanz fest mit der magnetischen Substanz verbunden ist. Während die erstgenannte Ausgestaltung für molekulare Substanzen vorgesehen ist, die nach Trennung der reversiblen Bindung ihre therapeutische Wirkung entfalten,

10   wurde die zweite, alternative Ausgestaltung vornehmlich für die Strahlentherapie konzipiert, bei der es nicht auf eine direkte Einwirkung einer dissoziierten molekularen Substanz, sondern auf das Aussenden einer biologisch wirksamen Strahlung ankommt.

15   Bei beiden Ausgestaltungen der magnetischen Partikel ist es vorteilhaft, einen Kern, in dem die magnetische Substanz vorliegt, mit einem Polymeren zu umhüllen. Ein solcher Grundaufbau sowie Modifikationsmöglichkeiten magnetischer Partikel

20   ist an sich bekannt, und in so weit kann auf bekannte Literatur und Offenbarungsquellen verwiesen werden, die sich auf den Aufbau und die Herstellung entsprechender magnetischer Partikel bzw. magnetischer Flüssigkeiten (Ferrofluide) beziehen, insbesondere die in die vorliegende Offenbarung mit

25   einzubeziehenden Veröffentlichungen in "Encyclopedia of Physical Science and Technology", Vol. 9, S. 321 ff., Academic Press, New York (1992) sowie die eingangs erwähnte DE-A-19 624 426. Erfindungsgemäß ist es dabei bevorzugt, ein Polymer als Hüllmaterial einzusetzen, welches in wässrigen

30   Medien, insbesondere im physiologischen Milieu, kompatibel ist und zur Stabilisierung im wässrigen Medium sowie bei der Anwendung dient.

Beispiele geeigneter Polymer schließen ein: Stärke, Stärke-ester oder -etherderivate, deren Abbauprodukte wie Dextrine,

35   ferner Dextrane, andere Polysaccharide, Pektine, Proteine wie Albumin, Casein, Kollagen, Gelatine und deren Derivate und

Abbauprodukte, sowie synthetische Polymere wie Polyvinyl-  
alkohol, Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylsäuren oder derglei-  
chen. Als zum Aufbau der Hülle zum vorstehend genannten Zweck  
besonders geeignete Polymere sind insbesondere Stärke,  
5 Stärkeabbauprodukte und -derivate, Dextrane, Dextrine,  
Serumalbumin und Polyvinylalkohol zu nennen.

Die Teilchengröße der magnetischen Partikel, die mittels  
dynamischer Lichtstreuung ermittelt werden kann, wird im  
10 Rahmen der Erfindung im Hinblick auf den gewünschten Zielort  
eingestellt. Es hat sich herausgestellt, dass ein ausgezeich-  
neter Kompromiss erzielt werden kann zwischen der Vermeidung  
einer Tendenz zur Embolie, einer guten Gängigkeit durch das  
vaskuläre System in Verbindung mit einer ausgezeichneten  
15 Anreicherung und Verteilung am gewünschten Zielort unter  
gleichzeitiger ausreichender Orientierungs- und Manövrier-  
fähigkeit durch das anzulegende Magnetfeld nach intraarte-  
rieller Applikation, wenn die Teilchengröße im Bereich von 20  
nm bis 500 nm und insbesondere im Bereich von 50 nm bis 200  
20 nm liegt. Die Einstellung der Teilchengröße erfolgt auf an  
sich bekannte Weise (siehe oben genannte Quellen), vornehm-  
lich durch Einstellung geeigneter Herstellungsbedingungen der  
magnetischen Teilchen (Nanopartikel).

25 Es wurde nachgewiesen, dass durch die erfindungsgemäße Vor-  
gehensweise eine vollständige Remission des Tumors bereits  
nach der kurzen Dauer einer einmaligen Behandlung erzielt  
werden konnte. Als besonders vorteilhaft erwies es sich, dass  
lediglich ein untergeordneter Anteil, gewöhnlich bereits bei  
30 10 - 50% der herkömmlich systemisch angewandten Dosis der  
jeweils eingesetzten therapeutischen Substanz, die vollstän-  
dige Remission des Tumors ohne das Auftreten von Nebenwir-  
kungen erreicht werden konnte. Eine 50%ige Reduktion des  
Tumorzvolumens ergab sich im Mittel je nach Dosis nach 4 bis 6  
35 Tagen (bei einer Dosis, die 20% der herkömmlich systemisch  
angewandten Dosis entspricht, ergab sich eine 50%-Reduktion

nach 3 - 12 Tagen (im Mittel 6 Tage); im Fall einer Dosis von 50% der herkömmlich systemisch angewandten Dosis ergab sich eine 50%-Reduktion nach 3 - 6 Tagen (Mittel: 4,2 Tage).

Insbesondere aufgrund der Möglichkeit, mit dem erfindungsge-  
5 mäßigen Konzept die Dosis der therapeutischen Substanz deutlich zu verringern und ggf. lediglich eine einmalige Applikation anzuwenden, werden die üblicher Weise mit der systemischen Therapie einhergehenden Nebenwirkungen minimiert bzw. völlig unterdrückt. Keines der behandelten Individuen entwickelte  
10 Nebeneffekte, wie Haarschwund (Alopecia), Geschwüre (Ulcus) oder Muskelatrophie, und der Allgemeinzustand (Gewicht, Nahrungsaufnahme, Kot und Urinausscheidungen, Aktivität) blieb während der gesamten 3-monatigen Beobachtungszeit im Vergleich zu den physiologischen Zuständen gesunder Indi-  
15 viduen normal. Es wurden keine signifikanten Änderungen im Serumeisengehalt oder bei den Leukozyten-Werten gefunden. Demgegenüber waren die Werte und Ergebnisse in Vergleichs- und Kontrollgruppen wesentlich schlechter. Im Falle der Applikation der therapeutischen Substanz ohne magnetische  
20 Substanz konnte zwar eine Remission bei hohen Dosen (bei 100% der herkömmlich systemisch angewandten Dosis nach 33 Tagen und bei 75% der herkömmlich systemisch angewandten Dosis nach 36 Tagen) erreicht werden, jedoch entwickelte sich Haar-  
25 schwund (Alopecia) nach 33 Tagen. Ferner zeigte sich eine blaugrüne Urin-Färbung, die Muskulatur wurde atrophisch, und der haarlose Bereich entwickelte Hautentzündung und Geschwür-  
bildung. Eine Reduzierung der allein angewandten therapeuti-  
schen Substanz auf 20 bzw. 50% der herkömmlich systemisch  
angewandten Dosis konnte keine Remission des Tumors herbei-  
30 führen, und Metastasen entwickelten sich im Mittel nach 48 Tagen. Die Nebenwirkungen waren in diesem Fall zwar geringer, jedoch ging die Behandlung mit Gewichtsverlust und einer Leukozytopenie einher. Die andere Vergleichsgruppe mit der magnetischen Substanz alleine (Ferrofluide) zeigte einen  
35 äußerst schlechten Krankheitsverlauf, bei dem das Tumor-  
volumen sich progressiv erhöhte, mit tastbaren, vergrößerten

Lymphknoten (Metastasen) nach 45 Tagen. Der Vergleich mit einer intravenösen Applikation (20 bzw. 50% Dosis der therapeutischen Substanz) zeigte lediglich eine sehr geringe Tumorremission, wobei die Volumenreduktion des Tumors nicht  
5 statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe war. Bei diesen Untersuchungen waren die Vergleichsbedingungen jeweils identisch (d.h. identische magnetische Substanz (Stärke-umhüllte Eisenoxidteilchen; Teilchendurchmesser 100 nm); Anlegen eines inhomogenen Magnetfelds mit maximaler  
10 magnetischer Flussdichte von z.B. 1,7 Tesla und einem entsprechenden Magnetfeldgradienten).

Nachfolgend wird die vorstehend genannte, erste Ausgestaltungsform der erfindungsgemäß eingesetzten magnetischen  
15 Partikel näher beschrieben.

Bei dieser Ausgestaltung ergeben sich deutliche Vorteile, wenn die therapeutische Substanz über ionische Wechselwirkung an die oben beschriebene Polymerhülle reversibel gebunden  
20 ist, wobei in diesem Fall das auf den magnetischen Kernpartikeln aufgebrachte Polymer ionisch geladenen Gruppen trägt. Weil die therapeutischen Effekte besonders günstig beeinflusst werden können, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass der Assoziationsgrad bei der reversiblen Bindung zwischen der  
25 therapeutischen Substanz und den ionisch geladenen Gruppen der Polymerhülle durch geeignete Umgebungsbedingungen eingestellt ist. Zu diesen geeigneten Bedingungen gehören insbesondere, jeweils einzeln oder kombiniert, die Temperatur, der pH-Wert und insbesondere die Osmolalität. Durch diese Faktoren kann in günstiger Weise eine sehr rasche Dissoziation  
30 der therapeutischen Substanz von den magnetischen Trägerpartikeln erreicht werden mit der Folge, dass die therapeutische Substanz nach der Lokalisierung im Zielort, z.B. einem Tumor, sehr rasch frei agieren kann und zu einem therapeutisch sehr effizienten, sprunghaften Anstieg der aktiven  
35 Wirkstoffkonzentration führt. So kann beispielsweise nach der

intraarteriellen Applikation und der direkt anschließenden Lokalisierung und Anreicherung mithilfe des am Zielort konzentrierten Magnetfelds zu einem Zeitpunkt, an dem die magnetischen Partikel am Zielort in ausreichendem Maße angereichert sind (etwa nach 30 Minuten bis zu wenigen Stunden) die physiologischen Umgebungsbedingungen so geändert werden, dass eine Dissoziation der ionischen Bindung der therapeutischen Substanz vom magnetischen Träger begünstigt wird. So kann z.B., je nach Art der ionischen Wechselwirkung, die gewünschte Dissoziation gefördert werden durch eine lokale Temperatur-Einrichtung oder durch die Zufuhr von physiologisch verträglichen, jedoch hinsichtlich der jeweiligen Faktoren wie pH und/oder Osmolalität entsprechend eingestellten Infusionslösungen, die vorzugsweise an derselben intraarteriellen Applikationsstelle zugeführt werden.

Je nach Art der einzusetzenden therapeutischen Substanz kann das Polymer der Hülle so mit ionisch geladenen Gruppen oder ionisierbaren Gruppen ausgestaltet oder modifiziert sein, dass die ionische Wechselwirkung in reversibler Weise stattfinden kann. Weist die therapeutische Substanz z.B. anionische Gruppen, wie z.B. Carboxylat-, Sulfat-, Sulfonat-, Phosphat- oder ähnliche Gruppen auf, sollte das Hüllpolymer entsprechend positiv geladene oder ionisierbare Gruppen tragen, was z.B. durch das Vorliegen oder Einbauen von primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen oder quarternären Ammoniumgruppen oder durch Iminogruppen realisierbar ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, bei therapeutischen Substanzen, die positiv geladenen oder ionisierbaren Gruppen wie primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppen oder quarternäre Ammoniumgruppen besitzen, die entsprechend umgekehrt geladenen oder ionisierbaren Gruppen wie Carboxylat-, Sulfat-, Sulfonat-, Phosphat- oder ähnliche Gruppen im Hüllpolymer vorzusehen oder einzubauen. Eine besonders günstige Kombination wird dann erreicht, wenn die Polymerhülle negativ geladene Phosphatgruppen trägt und die

therapeutische Substanz über eine oder mehrere Amino- oder Ammoniumgruppen an die Phosphatgruppen reversibel gebunden sind, weil dann einerseits anfänglich bei der Bereitstellung der beladenen magnetischen Partikel eine stabile Assoziation  
5 zwischen der Substanzkombination, andererseits aber eine rasche Dissoziation unter physiologischen Umgebungsbedingungen ermöglicht und gleichzeitig eine sehr gute Verträglichkeit und Übereinstimmung mit natürlichen Systemen realisiert wird. Als sehr geeignete Polymersubstanzen zur Beschichtung  
10 magnetischer Kerne haben sich mit Phosphatgruppen veresterte Stärkepolymere erwiesen.

Obgleich die Wahl der therapeutischen Substanz grundsätzlich keiner Einschränkung unterliegt, kommt das erfindungsgemäße  
15 Konzept am besten zum Tragen, wenn die therapeutische Substanz eine regionale bzw. lokale Wirkung entfalten soll. Besonders geeignete therapeutische Substanzen schließen ein: niedermolekulare, synthetische oder natürliche bzw. semi-synthetische Arzneimittel, Antikörper, insbesondere mono-  
20 klonale Antikörper und gentechnologisch erzeugte, vorzugsweise humane oder teils humane Antikörper, ferner Peptide, Angiogenesefaktoren, Hormone, Lymphokine und Cytokine, Lektine sowie Oligonukleotide und DNAs wie z.B. Antisense-Oligonukleotide oder gentherapeutisch einzusetzende DNA-  
25 Substanzen, die jeweils als isolierte DNA, in Form von Plasmiden oder Vektoren oder in geeigneten Carrier-Systemen eingeschlossenen Formen vorliegen können. Ein besonders nützliches Einsatzgebiet der vorliegenden Erfindung ist die regionale Therapie gegen Tumoren, aber auch die Behandlung  
30 lokaler Entzündungen, lokaler Arteriosklerose, lokaler Infektionen, insbesondere Pilzinfektionen, und dergleichen. Neben einem gentherapeutischen Ansatz kommen hier als therapeutische Substanzen insbesondere Antitumoragentien, vor allem Cytostatika sowie solche Substanzen in Betracht, die  
35 energiereiche Strahlung aussenden oder durch Aktivierung aussenden können. Als sehr gut geeignetes Cytostatikum ist

z.B. Mitoxantron zu nennen, welches stabil, jedoch günstig reversibel dissoziierbar an magnetische Teilchen gebunden werden kann. Der Aufbau eines solchen magnetischen Partikels ist in Fig. 4 beispielhaft bei mit Phosphatgruppen modifizierten, magnetischen Nanopartikeln gezeigt.

Die als Emittent energiereicher Strahlung zum Einsatz kommende therapeutische Substanz kann generell ein biologisch wirksamer Strahler sein und ist vorzugsweise ein  $\alpha$ - und/oder ein  $\gamma$ -Strahler oder eine solche Substanz, die durch Aktivierung, z.B. durch eine Neutronenquelle, in einen  $\alpha$ - und/oder  $\gamma$ -Strahler umgewandelt bzw. überführt werden kann. Als sehr Erfolg versprechende therapeutische Substanzen sind in diesem Zusammenhang Bor oder Borverbindungen zu nennen, die mittels Neutronenaktivierung in einen  $\alpha$ -Strahler verwandelt werden können. Der Einsatz von Bor oder Borverbindungen lässt sich auf hervorragende Weise mit dem erfindungsgemäßen magnetischen Trägersystem verwirklichen, wie nachfolgend näher beschrieben wird, und die dadurch ermöglichte Strahlentherapie ist einerseits sehr zielgerichtet als lokale Therapie realisierbar und bietet sich daher als nebenwirkungsarme Therapieform an.

Bei dieser Ausführungsform braucht die therapeutische Substanz nicht an der Oberfläche der magnetischen Teilchen reversibel assoziiert sein, wie dies oben im Rahmen der ersten Ausgestaltung der magnetischen Partikel für die Erfindung beschrieben wurde. Beim Einsatz einer energiereichen Strahlung emittierenden oder einer hierzu aktivierbaren therapeutischen Substanz ist es bevorzugt, dass die Substanz direkt im magnetischen Kern der Partikel integriert ist, oder dass der magnetische Kern mit der therapeutischen Substanz beschichtet ist. Dies kann ohne weiteres zum Beispiel realisiert werden, indem im ersten Fall geeignete, magnetische Eisen-Substanz-Legierungen oder -Verbindungen unter Bildung

- einer festen chemischen Verbindung zwischen der magnetischen Substanz und der therapeutischen Substanz bereitgestellt werden, wobei die Bezeichnung „Substanz“ das zur Emission energiereicher Strahlung befähigte oder aktivierbare Element
- 5 einschließt, z.B. magnetische Eisen-Bor-Legierungen, Eisenboride, Eisenborate oder magnetische, gemischte Oxide oder Mischoxide wie Borferrite, Bormagnetite, oder indem im zweiten Fall magnetische Teilchen aus z.B. Ferriten, Magnetiten oder ähnlichen Doppeloxiden beschichtet werden mit dem
- 10 Metall, dem Metalloxid oder einer anderen Verbindung des Elementes, welches zur Emission intensiver Strahlung befähigt ist oder aktiviert werden kann, z.B. mit Boroxid, Borsäure, Borationen oder Borsäureester. In den vorstehend genannten Legierungs- und Verbindungsbeispielen können wahlweise alter-
- 15 native oder weitere, ggf. die Magnetisierung, die Materialbeschaffenheit oder die Herstellung günstig beeinflussende Elemente in chemischer Verbindung vorliegen, z.B. Nickel, Kobalt, Seltenerdelemente, Silizium und/oder Kohlenstoff.
- 20 Ansonsten gelten die obigen allgemeinen Beschreibungen zur ersten Ausführungsform der magnetischen Teilchen hier entsprechend, insbesondere in Bezug auf die wahlweise vorgesehene Umhüllung mit geeigneten Polymeren, die bevorzugt eingestellte Teilchengröße der magnetischen Partikel sowie dem
- 25 Einsatz einer bevorzugten, gegenüber der herkömmlich angewandten Strahlendosis verminderten Dosis, die über die erfindungsgemäße, gezielt regionale Therapie realisierbar ist.
- 30 Die zur Therapieunterstützung einsetzbare Magnetfeldeinrichtung sollte ein inhomogenes Magnetfeld erzeugen. Zur günstigen Zielorientierung der magnetischen Partikel sind insbesondere stark inhomogene Magnetfelder erzeugende Elektromagnete mit einem Polmaximum bis 2,5 Tesla, vorzugsweise bis
- 35 2,0 Tesla, insbesondere im Bereich von über 1,0 Tesla bis 1,8 Tesla geeignet, wobei sich ausgehend vom festgelegten Pol-



maximum ein entsprechend starker Magnetflussgradient ein-  
stellt. Solche starken Magnetfelder sind in Kombination mit  
den oben beschriebenen magnetischen Partikeln sehr effizient.  
Dabei sollte sich das zuvor genannte Polmaximum vorzugsweise  
5 in einer Entfernung bis 20 mm, weiter bevorzugt bis 15 mm vom  
Polschuh des Elektromagneten einstellen. Bei einer solchen  
Ausgestaltung ergeben sich besonders günstige Magnetfluss-  
und Orientierungsbedingungen und insbesondere entsprechend  
günstige Gradienten, die die Anreicherung der magnetischen  
10 Partikel im gewünschten Zielorgan oder -gewebe unterstützen.  
Um die magnetischen Partikel effizienter in tieferen Körper-  
bereichen, z.B. beim Pankreas-Karzinom, zu fokussieren,  
können auch rotierende Magnetfelder in vorteilhafter Weise  
zum Einsatz kommen.

15

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von  
Beispielen, die jedoch nicht einschränkend aufzufassen sind,  
näher erläutert.

20

#### Beispiele und Vergleichsbeispiele

Die im Rahmen der Beispiele und Vergleichsbeispiele zum Ein-  
satz kommenden magnetischen Partikel (magnetische Nanoparti-  
25 kel für flüssige Zusammensetzungen/ Ferrofluide [FF]) wurden  
gemäß DE-A-19 624 426 hergestellt (erhältlich von Chemicell,  
Berlin, Deutschland). Sie bestehen aus einer kolloidalen  
Dispersion von magnetischen Partikeln, die durch nass-  
chemische Verfahren aus Eisenoxiden und -hydroxiden unter  
30 Erzeugung von speziellen Multidomänen-Teilchen erhältlich  
sind. Die Teilchen waren von mit Phosphatgruppen modifizier-  
ten Stärkopolymeren umhüllt, um diese unter verschiedenen  
physiologischen Bedingungen zu stabilisieren und eine ioni-  
schen Bindung an die therapeutische Substanz zu ermöglichen.  
35 Als therapeutische Substanz kam das Cytostatikum Mitoxantron  
zum Einsatz, welches kationische bzw. positiv ionisierbare

Gruppen trägt und in der Lage ist, an die mit veresterten Phosphatgruppen modifizierten Stärkopolymere der Umhüllung der Magnetitpartikel unter Ausbildung reversibler ionischer Wechselwirkungen reversibel zu binden.

5

Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt die Charakteristiken der verwendeten, beispielhaften Ferrofluide.

Tabelle 1

10

Zusammensetzung	wässrige Dispersion von polymerbeschichteten Magnetitpartikeln
pH	7,4
Teilchengrösse	100 nm (hydrodynamischer Durchmesser)
Konzentration an Magnetitpartikeln	50 mg/ml
Eisengehalt stabilisierendes Hüllpolymer	30 mg/ml 25 mg/ml, mit Phosphatester modifiziertes Stärkopolymer
Anzahl der Partikel	$\sim 10^{10}$ /ml
Geruch	neutral
Farbe	schwarz, Tageslicht-undurchlässig

15 Die als repräsentatives Beispiel zum Einsatz kommende Kombination zwischen Mitoxantron und Phosphatgruppen-tragenden magnetischen Teilchen ist in Fig. 1 schematisch dargestellt, wobei die relevanten chemischen Strukturen der therapeutischen Substanz sowie der Phosphatgruppen in der  
 20 Abbildung in Einzelteile aufgelöst und vergrößert dargestellt sind. Die positiv geladenen  $\text{NH}^+$ -Gruppen der Hydrochlorid-formen des Mitoxantrons (MTX-HCl) sind bei einem in der Zusammensetzung eingestellten pH von 7,4 mit den Phosphat-gruppen des Stärkederivats assoziiert. Die beladenen Ferro-  
 25 fluide enthielten 6,5 mg Mitoxantron pro 10 ml der flüssigen

Zusammensetzung. Da die Bindung der therapeutischen Substanz über die ionische Wechselwirkung reversibel war, konnte die Dissoziation mittels geeigneter Faktoren der physiologischen Umgebungsbedingungen wie pH, Osmolalität und Temperatur über  
5 die Veränderung der Blutelektrolyt-Konzentration gemäß den spezifischen Erfordernissen und der gewünschten Dissoziation eingestellt werden. In den nachfolgend beschriebenen Versuchen dissoziierte die therapeutische Substanz nahezu vollständig nach 60 Minuten.

10

Die Wirksamkeitstests wurden an einem aussagekräftigen Tiermodell durchgeführt, und zwar beim in Kaninchen etablierten VX-2-Schuppenzellkarzinom (A. Hough et al., Am. J. Pathol., 87, S. 537 (1977); C.S. Galasko und D. S. Muckle, Br. J.  
15 Cancer, 29, S. 59 (1974)). Nach Implantation in Weichgewebe vergrößert sich der Tumor rasch mit zunehmender Vaskularität in dessen Umgebung. Die Tiere entwickeln bald (innerhalb 2 - 3 Wochen) eine zentrale Tumornekrose, lokoregionale Lymphknotenmetastasen und hämatogene Metastasen in den Lungen. Zur  
20 Übertragung des Tumors wurden Fragmente von vitalem VX-2-Gewebe mit 1 mm Größe aus der Tumorperipherie von Donortieren entnommen, in ein spezielles Medium (RPMI 1640, 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, L-Glutamin) überführt und unmittelbar unter sterilen Bedingungen in den hinteren Gliedmaßen von anästhesierten  
25 Empfängerkaninchen (Gesamtanzahl n = 26) im Zufuhrbereich der femoralen Arterie implantiert. Die Chemotherapie wurde begonnen, wenn die Tumoren ein Volumen von etwa 3500 mm<sup>3</sup> erreichten. Zur Chemotherapie wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von 35 mg/kg Körpergewicht Ketamin  
30 und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin anästhesiert, dann wurde die Oberschenkel-bezügliche Arterie kanülisiert, und ein Verweilkatheter (0,8 mm Durchmesser) wurde nach Abtrennung der Oberschenkel-bezüglichen Vene vom saphenischen Nerv etwa 2 cm distal von der Leisten-bezüglichen Furche eingebracht.  
35 Die Mitoxantron-gebundenen Ferrofluide (FF-MTX) in unterschiedlicher Dosis, Mitoxantron allein (MTX) oder Ferrofluide

allein (FF) wurden mittels Perfusion über einen Zeitraum von 10 min verabreicht. Ferner wurden zum Vergleich Mitoxantron-gebundene Ferrofluide in verschiedenen Dosen intravenös verabreicht. In einer Kontrollgruppe wurde keine therapeutische Substanz angewandt.

Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt einen Überblick über das experimentelle Protokoll. "n" bezeichnet die Anzahl der jeweils pro Gruppe untersuchten Tumor-tragenden Tiere. Die Spalte "Dosis" gibt an, welcher Anteil an therapeutischer Substanz gegenüber der normalen systemischen Mitoxantron-Dosis (10 mg/m<sup>2</sup>) durch einmalige Applikation verabreicht wurde. Die intraarterielle Applikation erfolgte über die femorale Arterie, die intravenöse Applikation erfolgte über die Ohrvene. Das externe magnetische Feld wurde über dem Tumor konzentriert.

Tabelle 2

Gruppe	n	therapeutische Substanz	Dosis	Applikation	externes Magnetfeld
1a (Erf.)	5	FF-MTX	20%	intraarteriell	ja
1b (Erf.)	5	FF-MTX	50%	intraarteriell	ja
2 (Vergl.)	4	MTX	20%, 50%, 75% und 100%	intraarteriell	nein
3 (Vergl.)	2	Ferrofluide(FF)	20% und 50%	intraarteriell	ja
4a (Vergl.)	3	FF-MTX	20%	intravenös	ja
4b (Vergl.)	3	FF-MTX	50%	intravenös	ja
5 (Vergl.)	2	FF-MTX	20% und 50%	intraarteriell	nein
6 (Kontr.)	2	—	—	—	—

Zur Erzeugung eines inhomogenen, externen Magnetfelds wurde ein Elektromagnet mit einer magnetischen Flussdichte im Maximum von 1,7 Tesla eingesetzt. Die magnetische Flussdichte wurde auf die Tumorregion fokussiert mit einem speziell adaptierten Polschuh, welcher in Kontakt mit der Oberfläche des Tumors gebracht wurde. Dabei betrug die magnetische Flussdichte im Bereich der Tumoroberfläche etwa 1,7 Tesla und

etwa 10 mm unterhalb der Spitze des Polschuhs ungefähr 1,0 Tesla. Das Magnetfeld wurde über dem Tumor während der oben beschriebenen Applikation der Infusionslösung konzentriert und für insgesamt 60 min angelegt.

5

Zur Blutuntersuchung wurden Blutproben mittels Venenpunktur einmal wöchentlich entnommen und bei 2000 x g innerhalb von zwei Stunden zentrifugiert. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden Messungen verschiedener Parameter der Klinischen

10 Chemie (Eisen, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Alkalische Phosphatase und Laktatdehydrogenase) sowie von Blutzahl-Parametern (Zellwerte von Gesamtblut und differentiell Blut) durchgeführt.

15 Die statistische Auswertung verlief folgendermaßen:

Das Tumolvolumen wurde unter Verwendung der Formel für elliptische Massen ( $1/6 \pi a^2 b$ ,  $a$  = Weite der Horizontalachse,  $b$  = Länge der Vertikalachse) berechnet. Volumenänderungen wurden als Prozentwerte in Bezug auf 100% Tumolvolumen zu

20 Beginn der Behandlung ausgedrückt. Statistische Analysen der relativen Tumorumfänge wurden unter Verwendung des Einmalproben-t-Tests (mit einem konservativen, festen Wert von 100% für die Kontrollgruppe) sowie einem t-Test für zwei unabhängige Proben (Welch-Test) durchgeführt. Für Blutparameter

25 (Absolutwerte) wurden der t-Test für zwei unabhängige Proben angewandt. Die resultierenden, zweiseitigen p-Werte wurden als signifikant angesehen bei einem Wert von 0,05 oder darunter. Das Ergebnis war signifikant bei Werten von 0,01 bis 0,05 und hochsignifikant bei Werten unter 0,01. Die p-Werte wurden unter Verwendung der "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS), Version 9,0, auf einer Microsoft-Excel-Version 97 berechnet.

Die Ergebnisse für die in der obigen Tabelle 2 dargestellten  
35 Gruppen sind in den jeweiligen Figuren 5A bis 5G grafisch dargestellt, wobei die Entwicklung des mittleren Tumor-

volumens (mit den jeweils als Balken dargestellten maximalen und minimalen Werten) gegen dem zeitlichen Verlauf aufgetragen ist. Die Bezeichnung "Metastasen" bedeutet den Beginn der Metastasenbildung. Entsprechend bedeutet "Alopezie" den  
5 Beginn des festgestellten Haarschwunds. "Behandlung" zeigt die anfängliche, einmalige Behandlung an.

Die Ergebnisse der erfindungsgemäßen Gruppen 1a und 1b mit der intraarteriellen Applikation einer im Vergleich zur herkömmlich systemisch angewandten Dosis lediglich 20%-igen bzw.  
10 50%-igen Dosis an Cytostatikum (Mitoxantron), die auf magnetischen Teilchenträgern mittels ionischer Wechselwirkung reversibel gebunden waren, zeigen eine hoch signifikante Reduktion des Tumorumens bereits nach wenigen Tagen (vgl. Fig. 5A und 5B). Es wurden weder Metastasenbildungen noch Alopezie-Erscheinungen beobachtet. Demgegenüber war eine intraarterielle Gabe von Mitoxantron alleine mit schlechten Resultaten verbunden, da eine gegenüber systemischen Dosen verminderte Dosis (20 bzw. 50%) zu keiner Tumor-Remission,  
15 aber zur Metastasenbildung führte, während höhere Dosen (75 bzw. 100%) zwar eine Reduzierung des Tumorumens herbeiführte, jedoch im zeitlichen Verlauf wesentlich später einsetzte und zur Alopezie führte. (s. FIG. 5C) Ferrofluide alleine zeigten praktisch keine therapeutischen Wirkungen.  
20 Die entsprechende Figur 5D zeigt eine progressive Vergrößerung des Tumorumens mit tastbaren, vergrößerten Lymphknoten in der Leistengegend (Metastasen). Ferner zeigte der Vergleich mit der intravenösen Applikation (Gruppen 4a und 4b, Figuren 5E und 5F) keine statistisch signifikanten Tumor-Remissionen im Vergleich zur erfindungsgemäßen intraarteriellen Applikation. Fig. 5G zeigt in Bezug auf die Vergleichsgruppe 5 die Bedeutung der Unterstützung durch ein magnetisches Feld, in dem wie in den erfindungsgemäßen Gruppen 1a und 1b, jedoch ohne Anlegen des externen Magnetfeldes verfahren wurde. Zwar konnte ein weiteres Tumorumwachstum und die Metastasenbildung verhindert werden, jedoch wurde  
30

keine Remission des Tumors beobachtet. Zum Zeitpunkt der Behandlung zeigten weniger als 5% der Tiere eine geringe nekrotische Fraktion im Bereich des Tumors.

5 Die Resultate zu den lokalen und systemischen Nebeneffekten sind in den Figuren 6A und 6B zusammengefasst. Bei der Kontrollgruppe 6 verschlechterte sich im Beobachtungszeitraum der allgemeine Zustand. Die tumor erkrankten Tiere entwickelten Pneumonien, was die in den Figuren 6A und 6B bzgl. der  
10 Kontrollgruppe zu beobachtende Erhöhung der Leukozytenzahl erklärt. Demgegenüber zeigten sich keine signifikanten Änderungen bei den Leukozyten-Werten in den erfindungsgemäßen Gruppen 1a und 1b (s. Figuren 6A und 6B). Auch die übrigen untersuchten Parameter blieben im Beobachtungszeitraum von  
15 drei Monaten normal. Die Fig. 7A zeigt anschaulich die auch nach außen sichtbare, normale Erscheinung der Hinterläufe nach der Tumorbehandlung der erfindungsgemäßen Gruppe. Bei den Vergleichsgruppen wurden teils starke Nebenwirkungen beobachtet, etwa den oben bereits erwähnten Alopezie-  
20 Erscheinungen, Entfärbung des Urins, Entzündungserscheinungen, Geschwürbildung und Gewichtsverlust. Im Gegensatz zur äußerlich normalen Erscheinung in der erfindungsgemäßen Gruppe (vgl. Fig. 7A) sind die starken Nebenwirkungen einer intraarteriellen Applikation mit dem Cytostatikum alleine  
25 (Vergleichsgruppe 2) deutlich in Fig. 7B zu sehen.

Zur histologischen Beurteilung und zur Magnetresonanz-Darstellung (vgl. die jeweiligen Figuren 3 und 1) wurden unmittelbar nach der einmaligen Applikation von 50% FF-MTX in  
30 die femorale Arterie und dem Anlegen des magnetischen Felds für 60 min der Tumor entfernt und in 3,7%-igem Formalin fixiert. 5 µm dicke Paraffin-Schnitte des Tumors wurden geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die histologische Anfärbung führte zu den in den Figuren 2 und 3A  
35 bis 3C dargestellten histologischen Befunden.

Daneben wurden nach einer entsprechenden Applikation und 6 h nach Anlegen des externen magnetischen Feldes eine Magnetresonanz-Bildanalyse an vier Tumor-tragenden Tieren durchgeführt. Die Bilddarstellungen wurden bei 1,5 Tesla mittels  
5 eines klinischen Magnetresonanz-Scanners (ACS-NT; Philips) ausgeführt. Eine Fett unterdrückende T1-gewichtete Turbospin-Echosequenz wurde zur Bilddarstellung (TR 535, TE 20, Echozugklänge 5) verwendet. Dies führte zu den in Figuren 1A und 1B gezeigten Magnetresonanz-Bilddarstellungen.

10

Weiterhin wurden Versuche zur Quantifizierung der magnetischen Partikel beziehungsweise freigesetzten Wirkstoffe in verschiedenen Geweben und Organen durchgeführt. Die Ergebnisse sollen nachstehend unter Bezugnahme auf die  
15 Figuren 8 bis 12 verdeutlicht werden.

In Figur 8 ist die quantitative Anreicherung von  $^{59}\text{Fe}$  mit und ohne Magnetfeldunterstützung (Magnetic Drug Targeting) gezeigt. Mit Magnetfeldeinwirkung konnte im Tumor 34 mal mehr  
20  $^{59}\text{Fe}$  (entspricht magnetischen Partikel) angereichert werden, peritumoral sogar mehr als 236 mal mehr. Dies ist gerade für die sano-Situation (d.h., der Tumor ist vollständig erfasst, inklusive der Tumorausläufer) sehr wichtig. Ferner sieht man eine wesentlich geringere Anreicherung in Leber, Milz und  
25 Knochenmark. Die Angaben in Fig. 8 beziehen sich immer auf Aktivität(Bq)/Gramm Gewebe.

In den Figuren 9A und 9B sind die HPLC-Analysen bezüglich des freigesetzten Wirkstoffs Mitoxantron nach intraarterieller  
30 Applikation ohne Magnetfeldeinwirkung (Fig. 9A) und mit Magnetfeldeinwirkung (Fig. 9B) angegeben. Aus der relativen Angabe Mitoxantron ( $\mu\text{g}$ )/Gramm Gewebe ergibt sich im Tumor eine 6-fach größere Anreicherung, peritumoral eine 9-fach stärkere und im gleichzeitig befallenen Lymphknoten eine 5-  
35 fach stärkere Anreicherung bei der erfindungsgemäßen



Applikation (Fig. 9B) gegenüber den Vergleichswerten ohne Magnetfeldeinwirkung (Fig. 9A).

Bei dem in den Figuren 10A und 10B gezeigten Vergleich ergibt  
5 sich bezogen auf die applizierte Menge an Mitoxantron  
(5 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche) im Tumor eine 120-fach stärkere  
Anreicherung bei intraarterieller Applikation mit  
Magnetfeldeinwirkung gegenüber der intraarteriellen  
Applikation ohne Magnetfeldeinwirkung. Peritumoral ergibt  
10 sich eine 30-fach stärkere Wirkstoffanreicherung.

Die in den Figuren 11 und 12 gezeigten Vergleichsversuche  
zeigen, dass die alleinige intravenöse Gabe des Wirkstoffs  
Mitoxantron nahezu keine Anreicherung im entsprechenden  
15 Muskelareal ergibt. Hingegen kommt es zu einer starken  
Konzentrierung in Leber, Niere und Milz.

5

10

15

### Patentansprüche

- 20 1. Magnetische Partikel, die eine magnetische Substanz in Kombination mit einer therapeutischen Substanz umfassen, zur Magnetfeld-unterstützten, regionalen Therapie von Krankheiten mittels intraarterieller Applikation.
- 25 2. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Kern, in dem die magnetische Substanz vorliegt, sowie eine Hülle aus einem Polymer umfasst.
- 30 3. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilchengröße der magnetischen Partikel größer als 50 nm und kleiner als 200 nm beträgt.
- 35 4. Magnetische Partikel gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz in einer Dosis vorliegt, berechnet auf Basis der partikelgebundenen Menge, die 10 bis 50 % der herkömmlich systemisch angewandten Dosis entspricht.
- 40 5. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz über ionische Wechselwirkung an die Polymerhülle reversibel gebunden ist, die ionisch geladene Gruppen trägt.

6. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerhülle negativ geladene Phosphatgruppen trägt und dass die therapeutische Substanz über eine oder mehrere Amino- oder Ammoniumgruppen an die Phosphatgruppen reversibel gebunden ist.
7. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Polymerhülle aus mit Phosphatgruppen veresterten Stärkopolymeren gebildet ist.
8. Magnetische Partikel gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Assoziationsgrad der reversiblen Bindung zwischen der therapeutische Substanz und den ionisch geladenen Gruppen der Polymerhülle durch Bedingungen der Temperatur, des pH-Werts und/oder der Osmolalität eingestellt ist.
9. Magnetische Partikel gemäß einem der vorangehenden Ansprüche mit einem Cytostatikum als therapeutischer Substanz.
10. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Cytostatikum Mitoxantron ist.
11. Magnetische Partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einer DNA-Substanz als therapeutischer Substanz.
12. Magnetische Partikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz ein biologisch wirksamer Strahler ist oder durch Aktivierung in einen biologisch wirksamen Strahler umgewandelt werden kann.
13. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz ein  $\alpha$ - und/oder ein  $\gamma$ -Strahler ist oder durch Aktivierung in einen  $\alpha$ - und/oder ein  $\gamma$ -Strahler umgewandelt werden kann.

14. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz Bor oder eine Borverbindung ist, die mittels Neutronenaktivierung in  
5 einen  $\alpha$ -Strahler umgewandelt werden kann.

15. Magnetische Partikel gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die therapeutische Substanz im magnetischen Kern der Partikel integriert ist, oder dass  
10 der magnetische Kern mit der therapeutischen Substanz beschichtet ist.

16. Magnetische Partikel gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Therapie  
15 unterstützt wird von einem inhomogenen Magnetfeld mit einem Polmaximum von über 1,0 Tesla bis 2,0 Tesla.

17. Magnetische Partikel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die magnetischen Partikel in einer zur  
20 Infusion oder Perfusion ausgestalteten Flüssigkeit vorliegen.

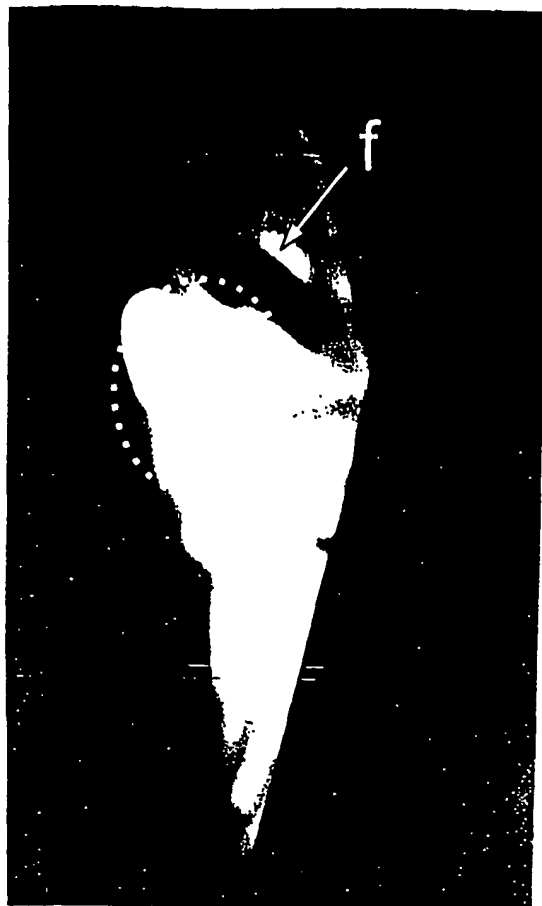
18. Verwendung von magnetischen Partikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 zur regionalen Therapie gegen Tumoren.

25 19. Verwendung von magnetischen Partikeln gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 zur regionalen Therapie gegen lokale Infektionen.

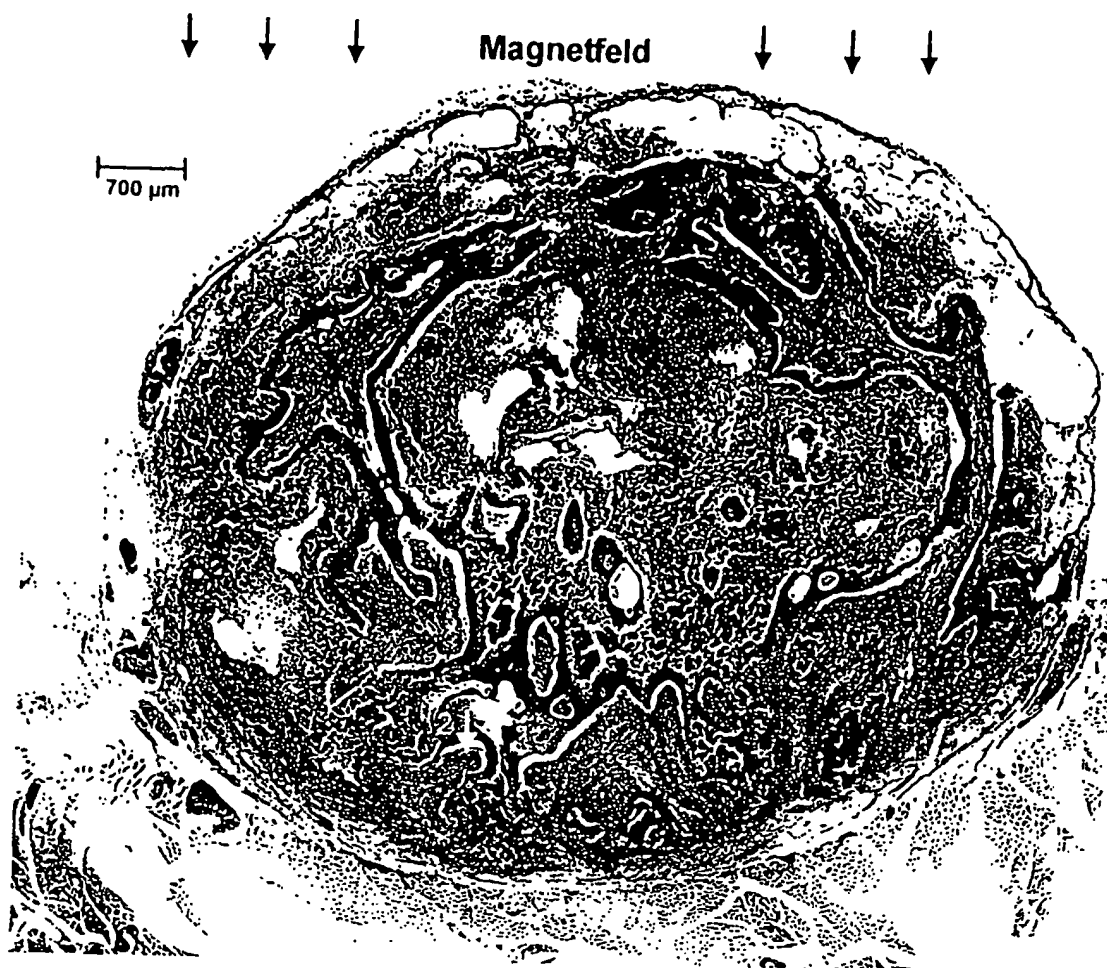
20. Verwendung von magnetischen Partikeln gemäß einem der  
30 Ansprüche 1 bis 17 zur regionalen Therapie gegen lokale Entzündungen.



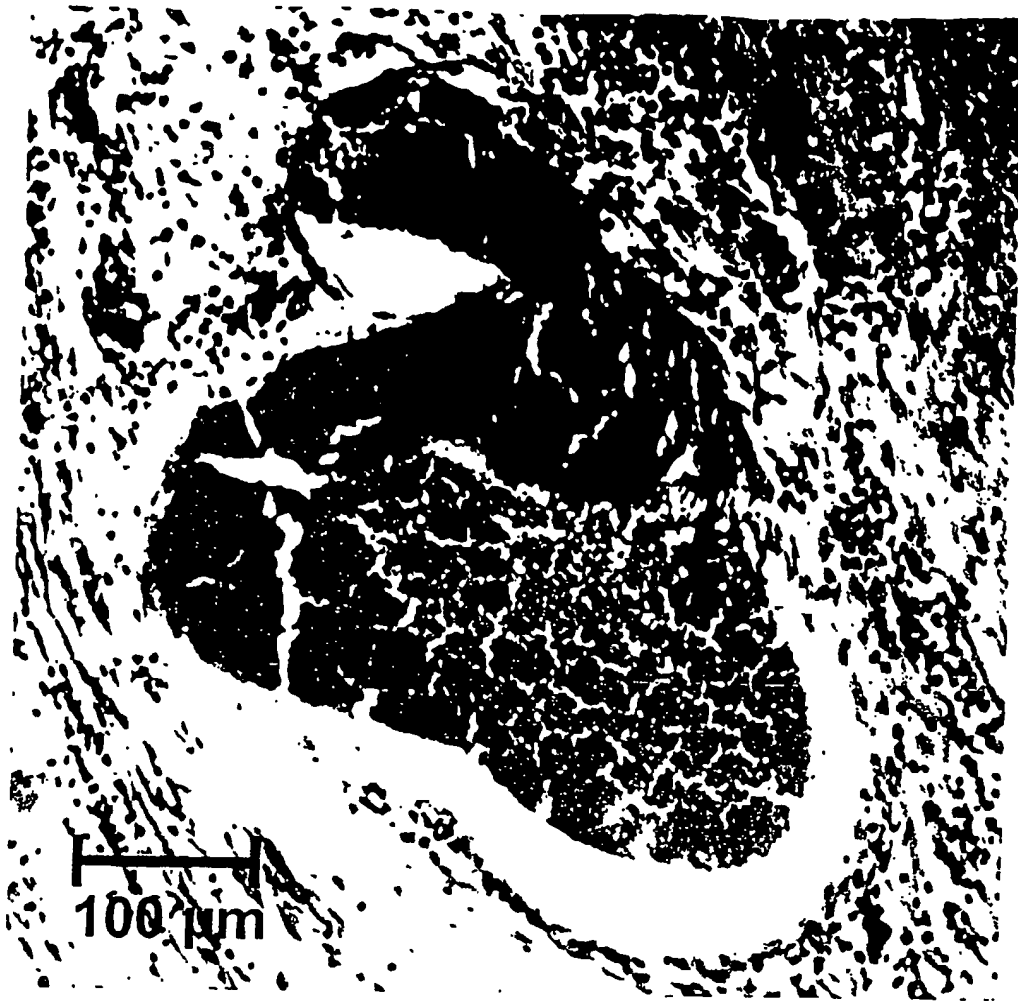
Figur 1A



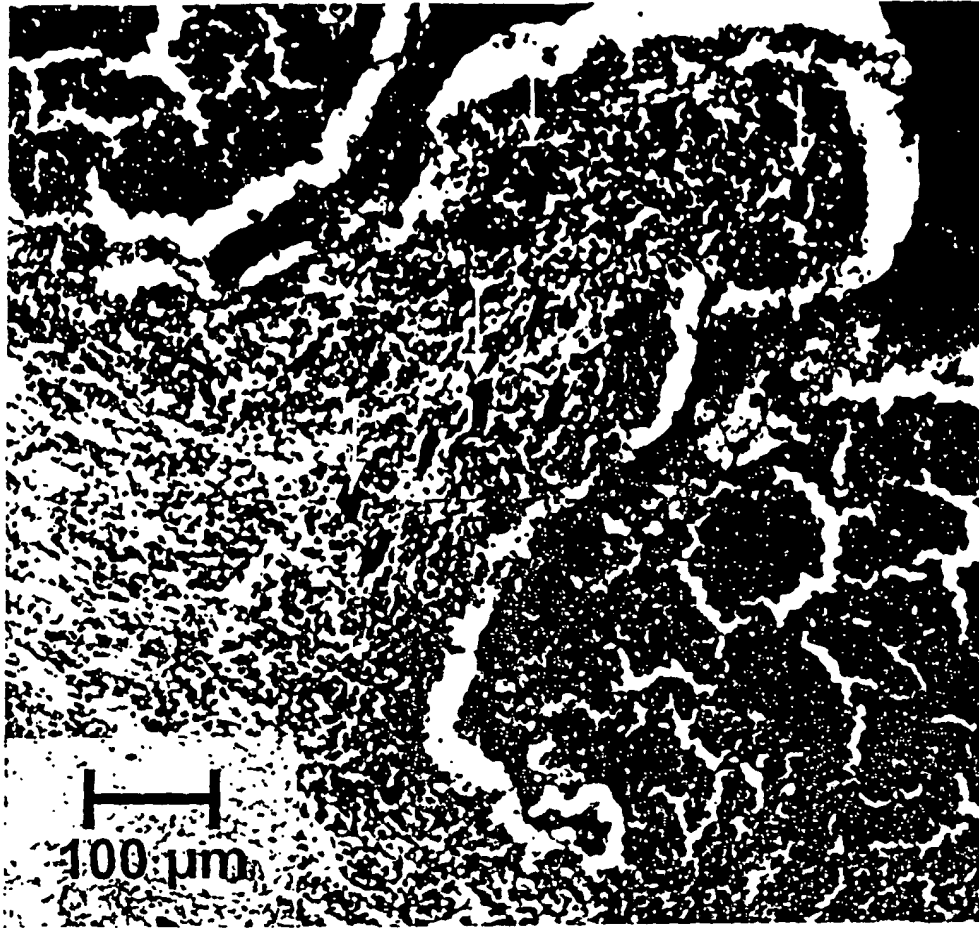
Figur 1B



Figur 2



Figur 3A



Figur 3B





Figur 3C

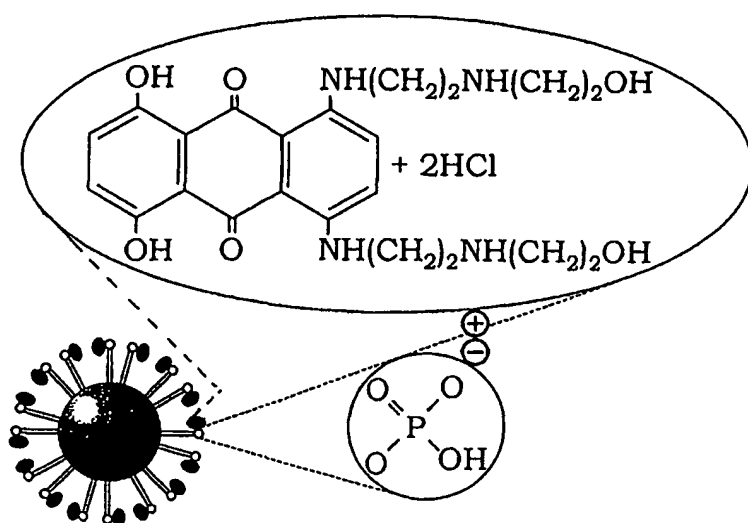


FIG. 4

7/16

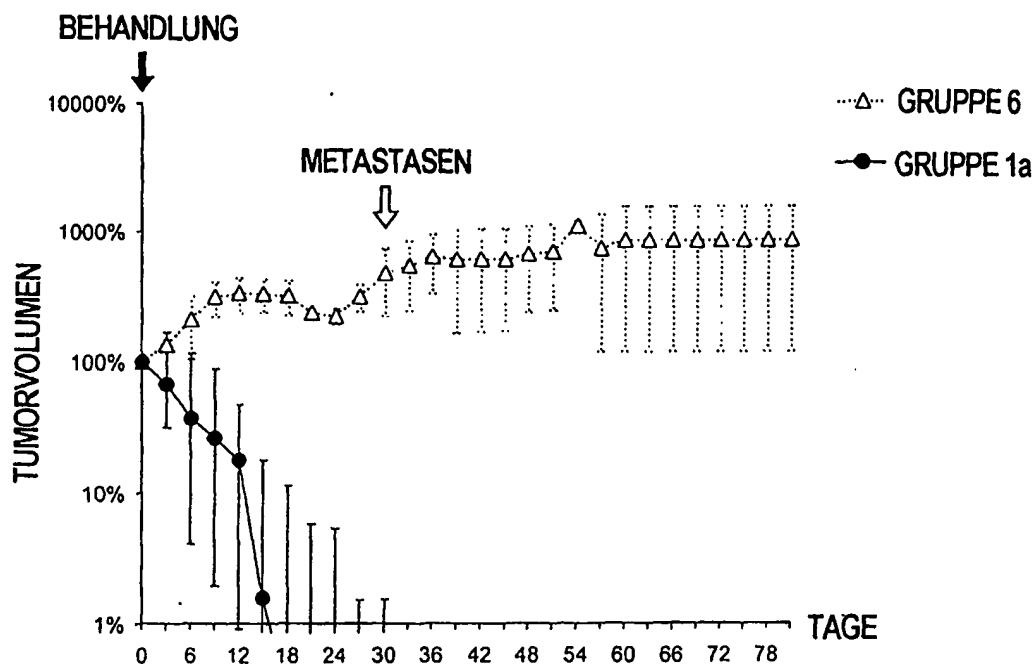


FIG. 5 A

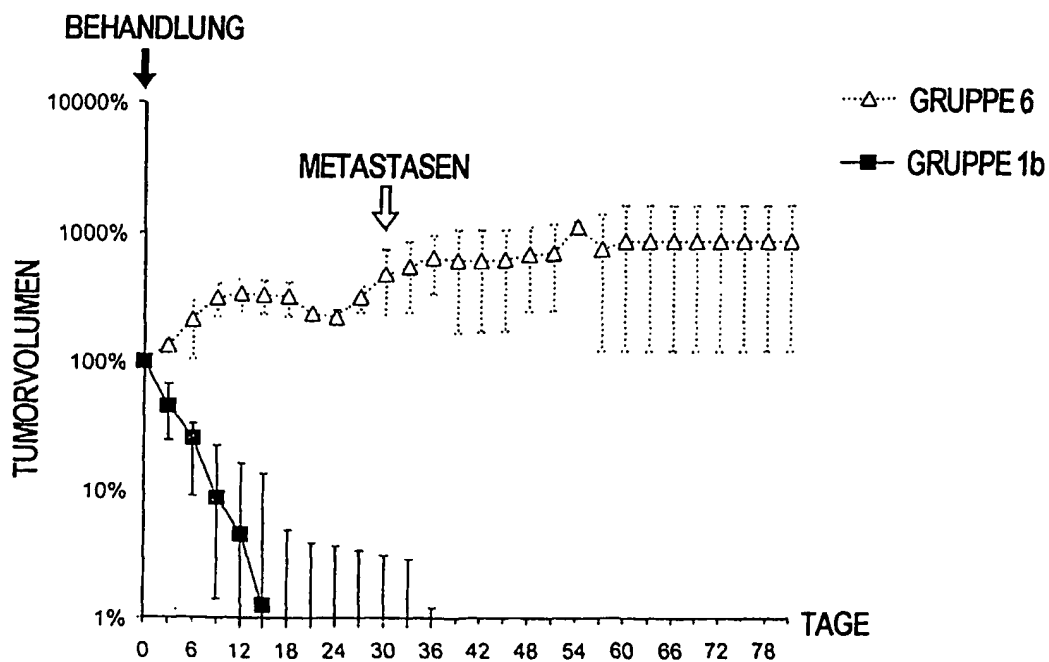


FIG. 5 B

8/16

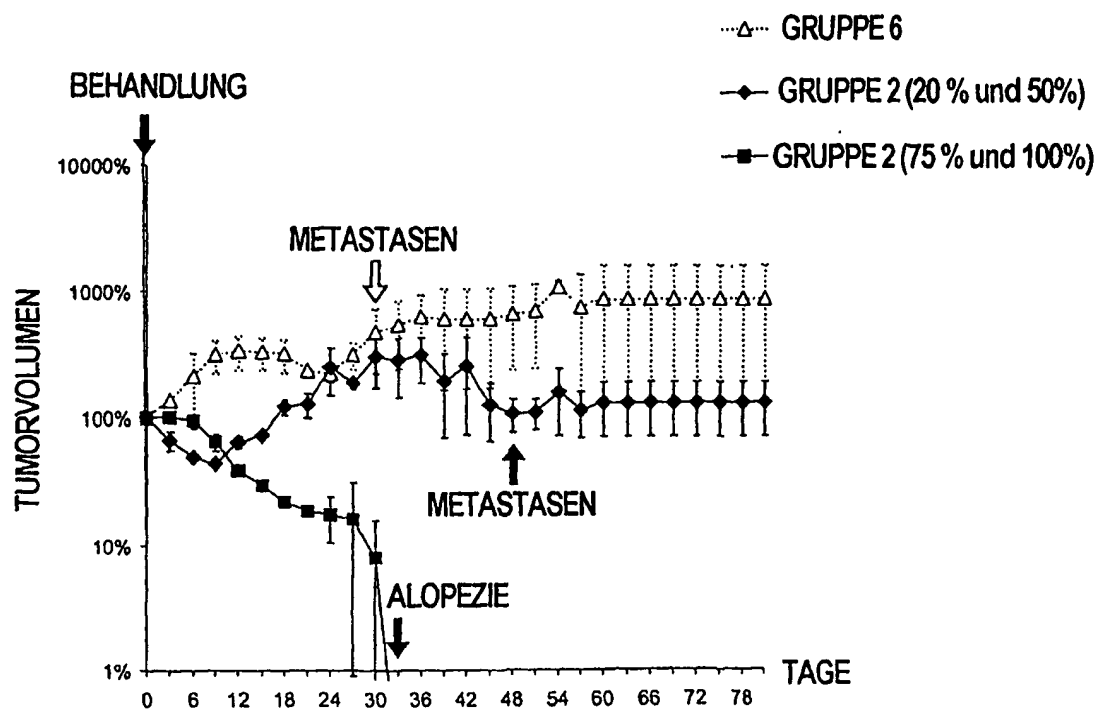


FIG. 5 C

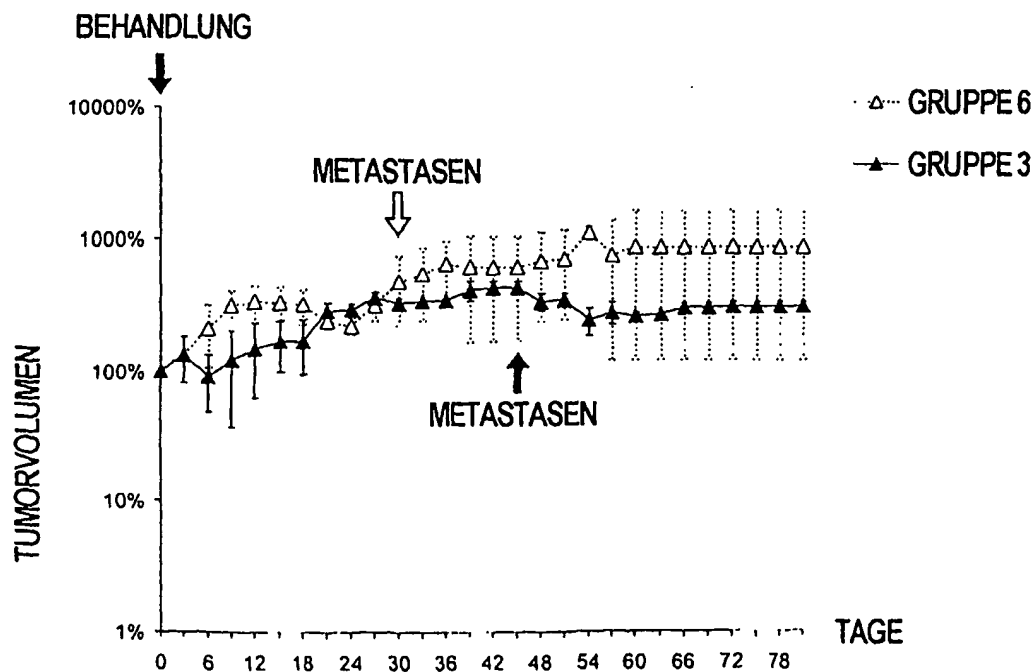


FIG. 5 D

9/16

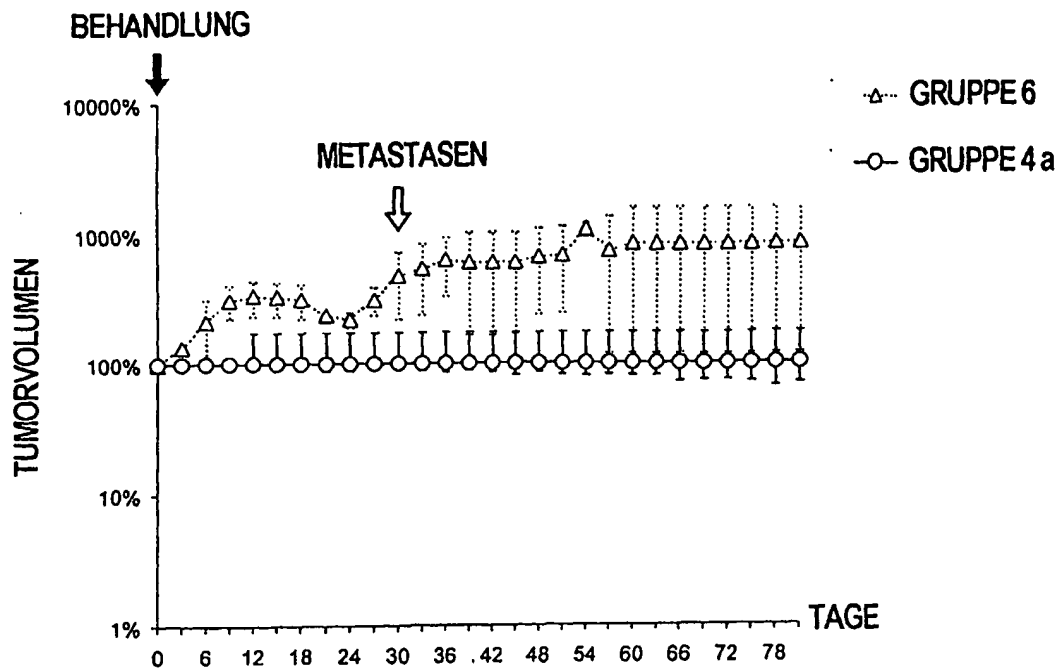


FIG. 5 E

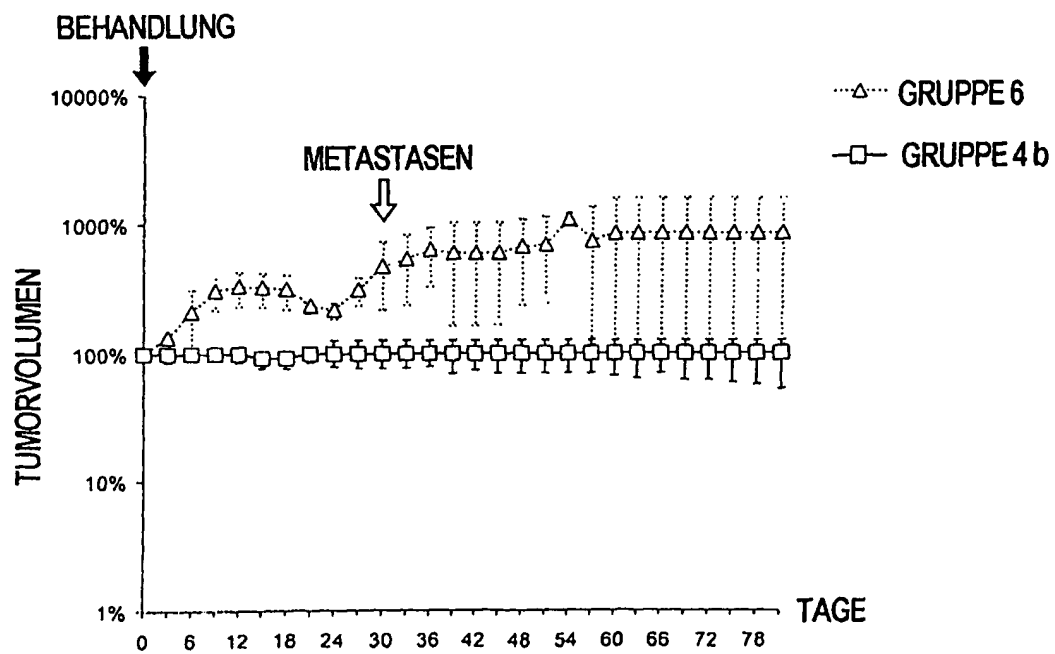


FIG. 5 F

10/16

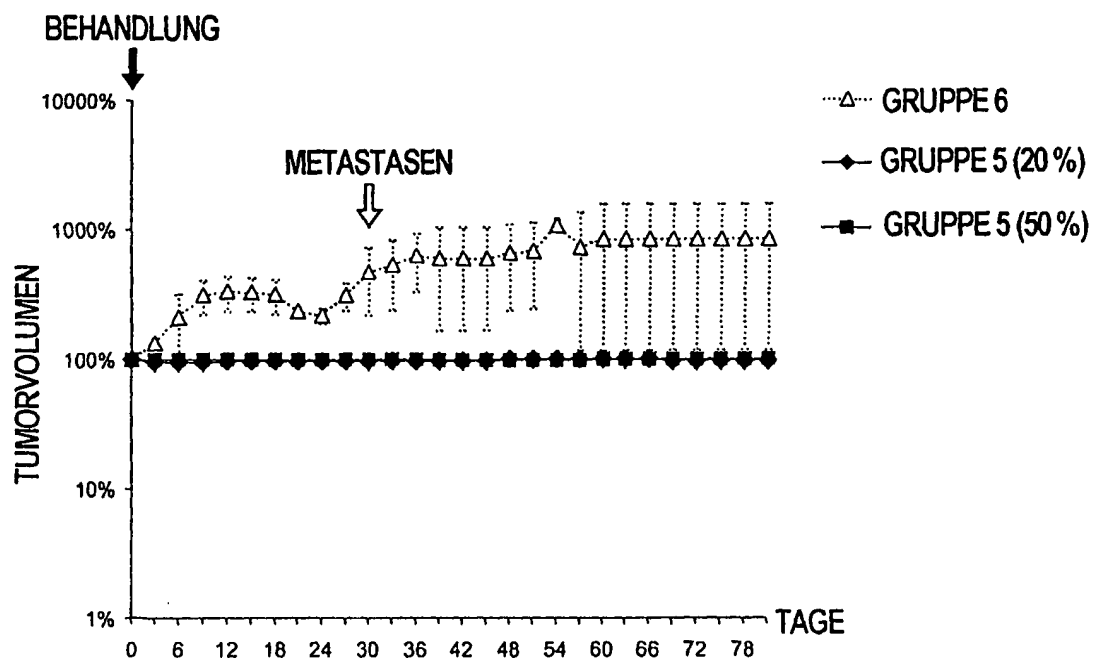


FIG. 5 G

11/16

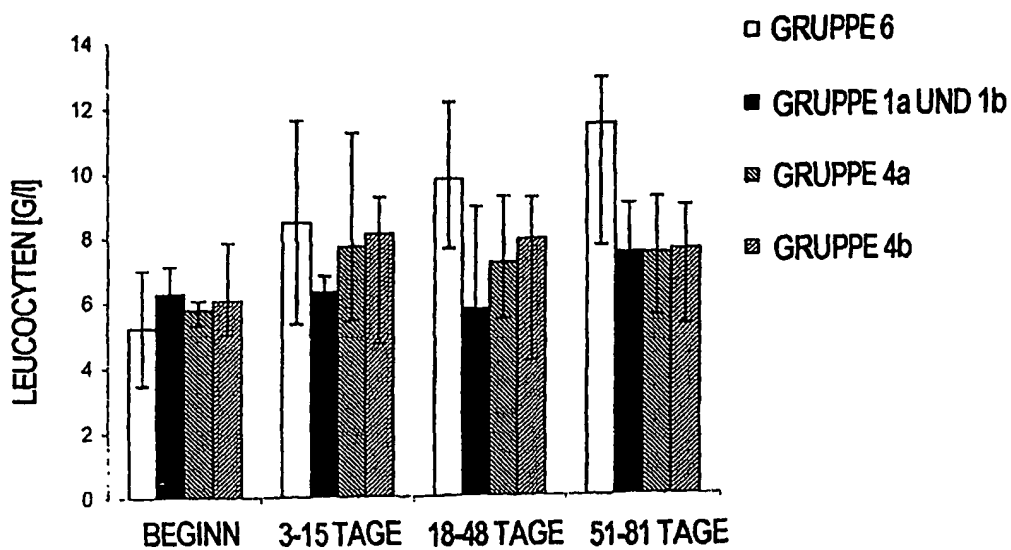


FIG. 6 A

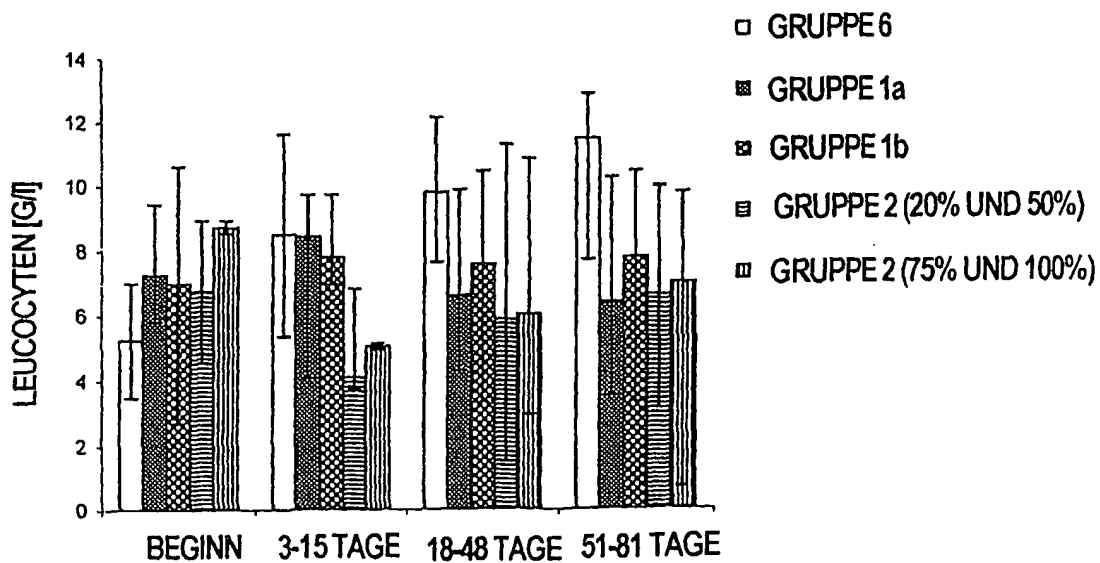


FIG. 6 B

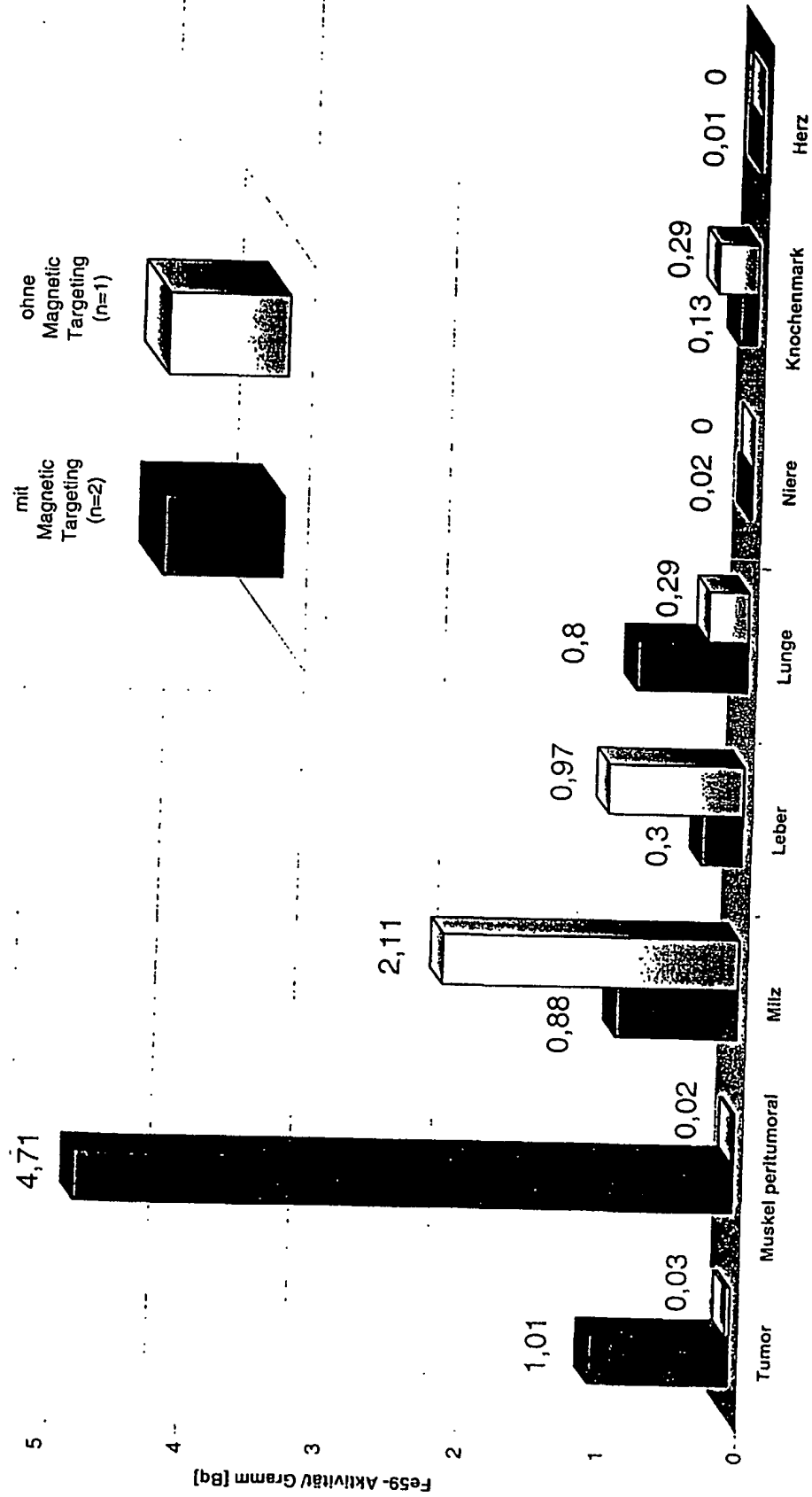


Figur 7A



Figur 7B

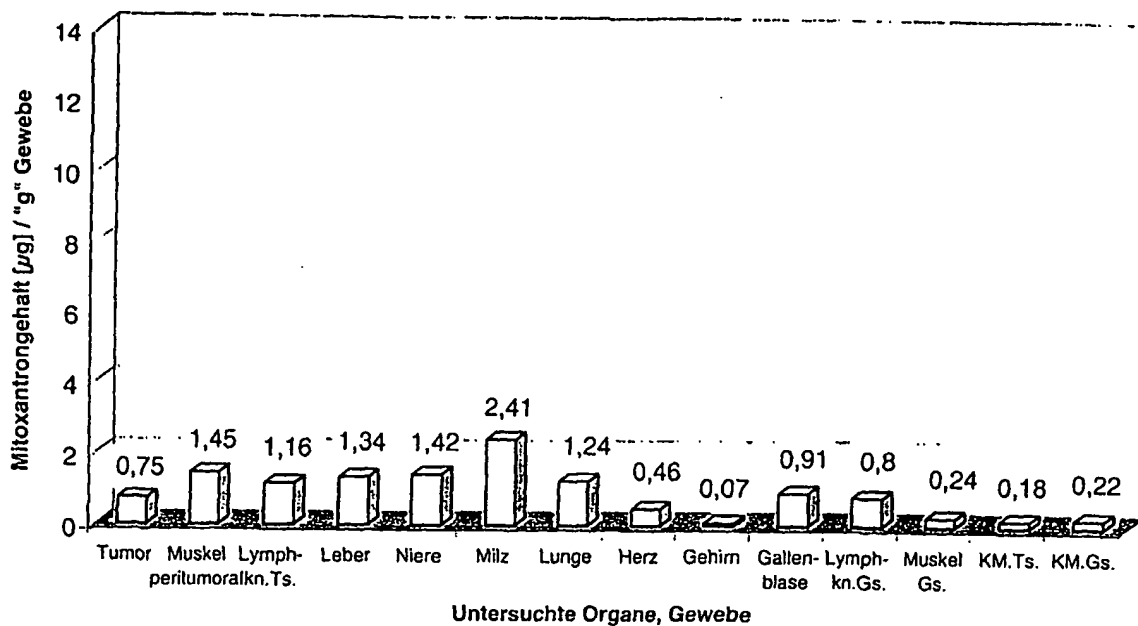




Figur 8

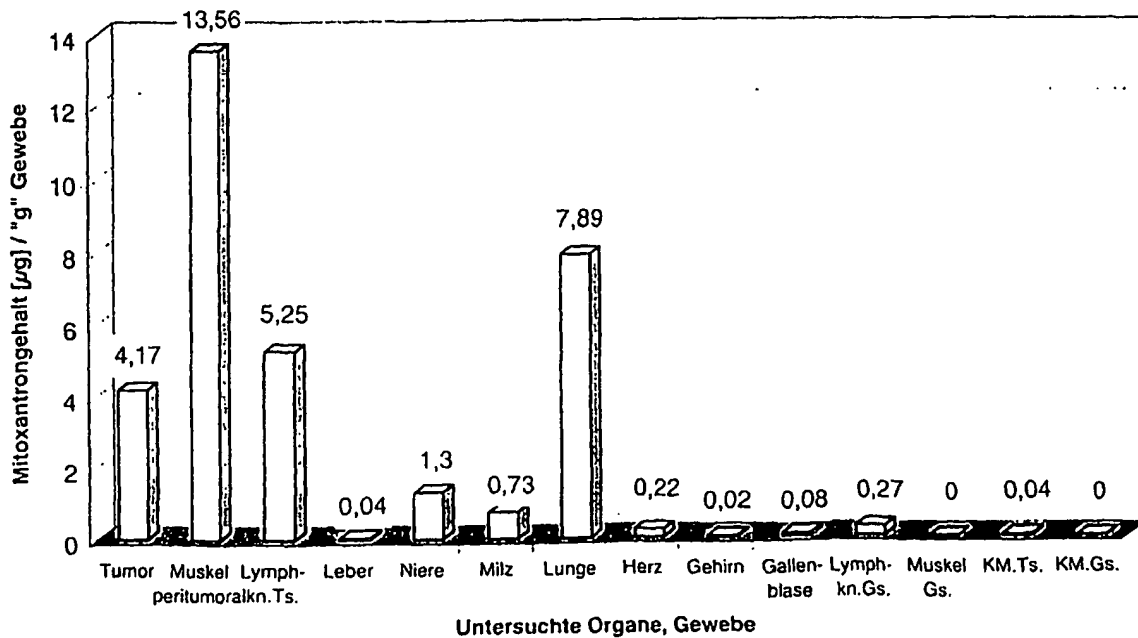
14/16

Mitoxantronverteilung nach i.a. Applikation von 5mg / m<sup>2</sup> Mitoxantron  
ohne Magnetfeldeinwirkung (Kan.Nr.202)



Figur 9A

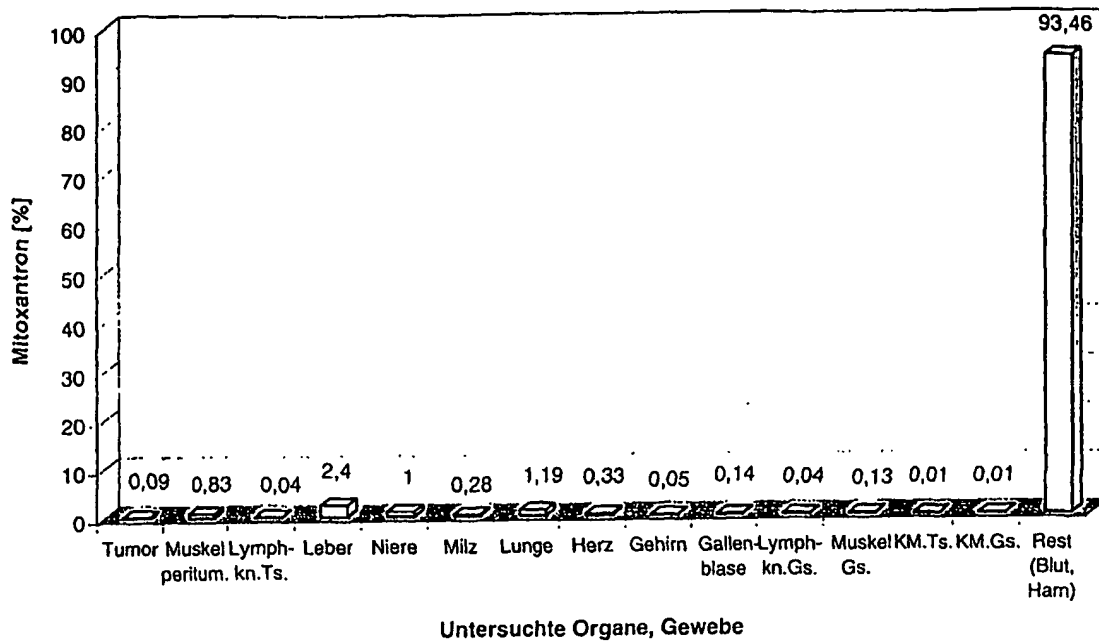
Mitoxantronverteilung nach i.a. Applikation von 5mg / m<sup>2</sup> Mitoxantron mit  
Magnetfeldeinwirkung (Kan.Nr. 130)



Figur 9B

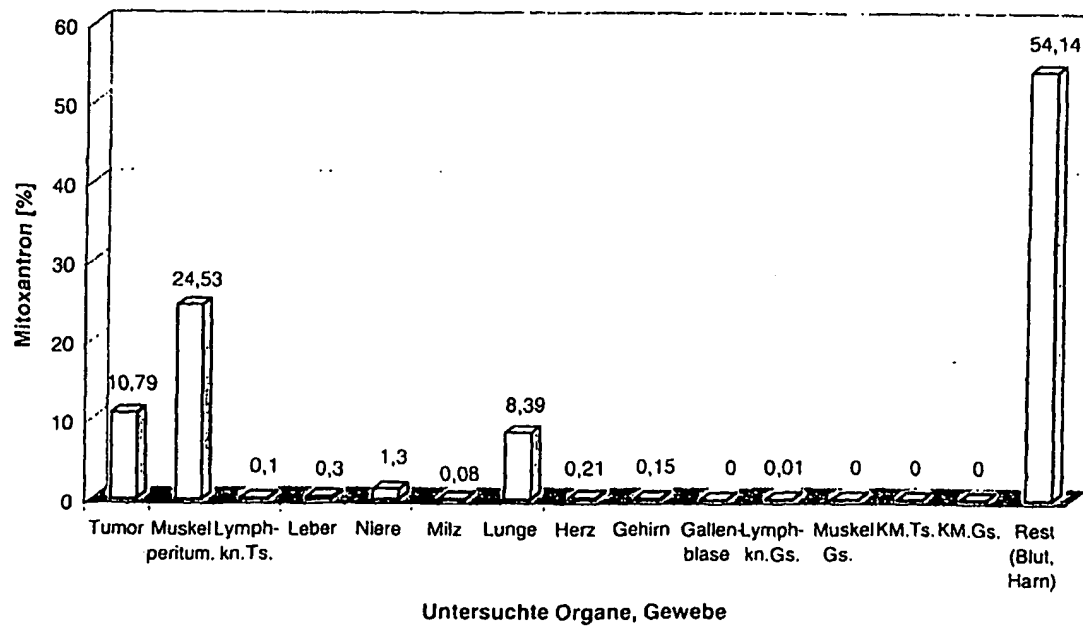
15/16

Mitoxantronverteilung nach i.a. Applikation von 5mg / m<sup>2</sup> ohne  
Magnetfeldeinwirkung (Kan.Nr.202)



Figur 10A

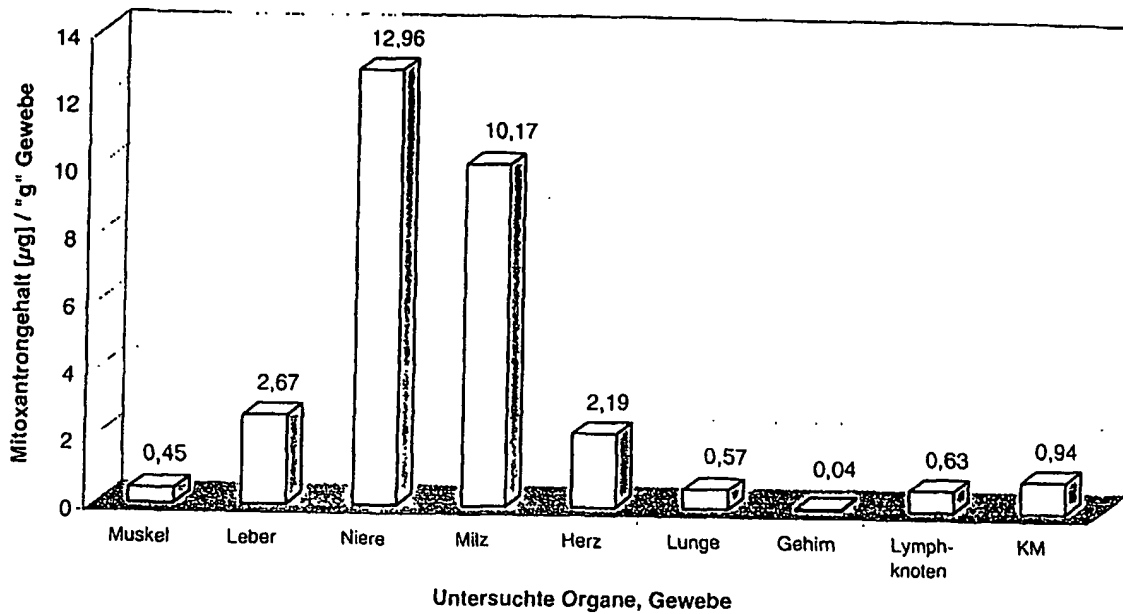
Mitoxantronverteilung nach i.a. Applikation von 5mg / m<sup>2</sup>  
Mitoxantron mit Magnetfeldeinwirkung (Kan.Nr. 130)



Figur 10B

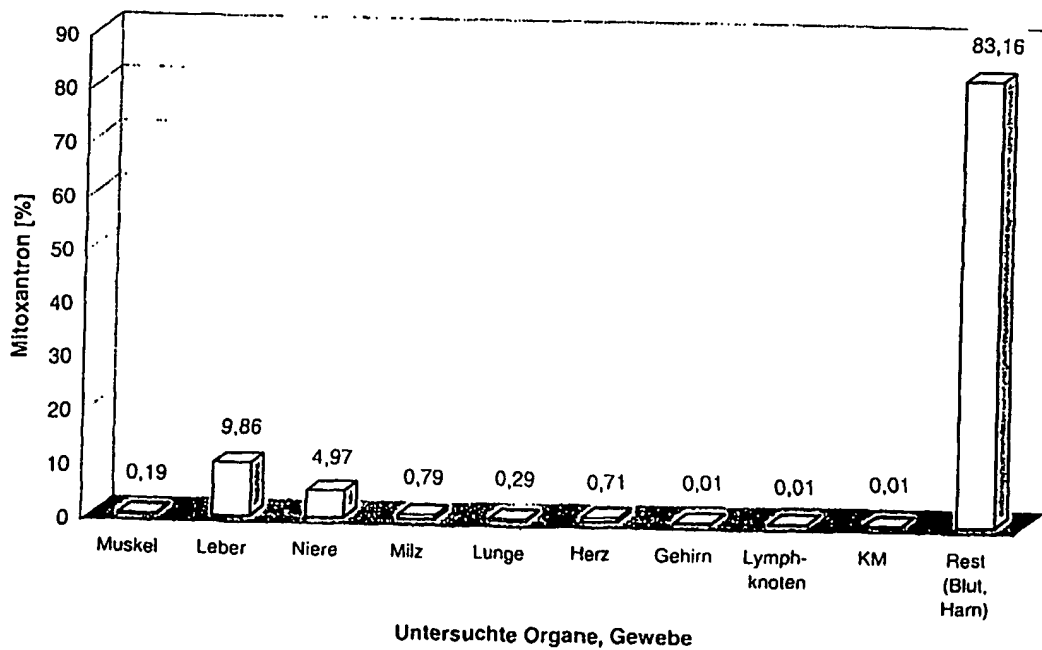
16/16

Mitoxantronverteilung nach i.v. Applikation von 10mg / m<sup>2</sup>  
Mitoxantron (Kan.Nr.38)



Figur 11

Mitoxantronverteilung nach i.v. Applikation von 10mg / m<sup>2</sup> Mitoxantron  
(Kan.Nr.38)



Figur 12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**